

**Die Permeation organischer Kationen
in menschliche Erythrocyten
und ihre Hämoglobinbindung**

Werner Dunau

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0056

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Kiese

Die Permeation organischer Kationen
in menschliche Erythrocyten und ihre
Hämoglobinbindung



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Werner Dunau
aus
Aichach

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 1977



Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	S.1
METHODIK	3
1. Herstellung des Erythrocytenkonzentrates ..	3
2. Herstellung der Erythrocytensuspension	4
3. Herstellung und Inkubation der Substanz- lösungen	5
4. Substanzen u. Bestimmungsmethoden	7
5. Berechnung des von den Erythrocyten aufge- nommenen Anteils der inkubierten Substanz- menge (Erythrocytenbindung)	9
6. Berechnung des an Hämoglobin gebundenen An- teils β der in die Erythrocyten eingedrun- genen Substanzmenge	11
ERGEBNISSE	12
DISKUSSION	18
A) Zur Methodik	18
1. Bindung an Moleküle im Extrazellulärraum	18
2. Adsorption an die Membran	20
3. Fehler bei der Berechnung der Hämoglobin- bindung	21
B) Zu den Ergebnissen	24
1. Die Permeation der Substanzen in die Erythrocyten	24
2. Die Bindung der Substanzen an Hämoglobin	25
a) Abhängigkeit der Hämoglobinbindung von der Lipoidlöslichkeit d. Substanzen ...	25
b) Abhängigkeit der Hämoglobinbindung vom Ionisationsgrad der Substanzen	29
c) Vergleich der hier gefundenen Bindungs- werte mit d. Ergebnissen anderer Autoren	30
d) pH-Abhängigkeit der Hämoglobinbindung	33

SCHLUSSFOLGERUNGEN	35
ZUSAMMENFASSUNG	37
LITERATURVERZEICHNIS	39

I) EINLEITUNG

Während bei den wirbellosen Tieren das Hämoglobin im Blut gelöst zirkuliert, befindet es sich bei den Wirbeltieren im Innern einer Zelle. Diese Transportform bietet eine Reihe von Vorteilen (Frick 1961, Zahler 1971), bedeutet aber auch die Errichtung einer Sperre, die den freien Stoffaustausch zwischen Hämoglobin und Plasma behindert. Diese Membranbarriere, so ergab sich nach über siebenzigjähriger Forschung (Übersicht bei Schanker 1962), besteht aus einer bimolekularen Schicht polar angeordneter Phospholipidmoleküle, in der sich Poren befinden (Marti 1968). Im Organismus gibt es viele solcher Lipoidmembranen, die die freie Verteilung eines Arzneimittels im Körper behindern können. Auf der Suche nach den Gesetzmäßigkeiten der Permeation fand sich, daß die Permeationsgeschwindigkeit mit der Lipoidlöslichkeit der Arzneimittel ansteigt. Dies zeigte sich unter anderem für die Blut-Liquor-Schranke (Butler 1942, Davson 1955, Mark et al. 1958, Rall et al. 1959, Brodie et al. 1960), für den Übertritt in die Leber (Kurz 1964), das Überschreiten der Placentarschranke (Apgar 1952, Baker 1960, Hagermann 1960, Fasching 1968, Maickel 1969), sowie für die Resorption aus Magen (Schanker et al. 1957, Hogben et al. 1957, Shore et al. 1957, Kakemi et al. 1967) und Darm (Brodie und Hogben 1957, Schanker et al. 1958, Hogben et al. 1959).

Schon früh wurde untersucht, welche Substanzen durch die Membranen in Zellen eindringen können. Nachdem Erythrocyten leicht zu isolieren sind, verwundert es nicht, daß diese Zellen die ersten tierischen Zellen waren, an denen Studien über die Permeabilität gemacht wurden:

So untersuchten Gryns (1896) und Hedin (1897) schon Ende des 19. Jhdt., ob verschiedene Stoffe in die roten Blutkörperchen permeieren. Während bei diesen ersten Untersuchungen die Frage im Vordergrund stand, ob bestimmte Substanzen in die Zellen eindringen, interessierten bald die Gesetzmäßigkeiten dieser Permeation: Mond und Hoffmann (1928) fanden eine Abhängigkeit zwischen Permeierfähigkeit und Molekularvolumen. Orzechowski (1930) sowie Höber und Pupilli (1930) entdeckten, daß schlecht lipoidlösliche Stoffe nicht ins Erythrocyteninnere vordringen. Nachdem Jacobs (1931) vermutet hatte, daß auch an der Erythrocytenmembran die Lipoidlöslichkeit eines Arzneimittels als entscheidender Faktor dessen Permeationsgeschwindigkeit bestimmt, zeigten Schanker et al. (1961) an 18 organischen Basen, daß die Eindringgeschwindigkeit in die Erythrocyten mit ihren Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizienten korreliert ist.

Hilzenbecher (1972) bestimmte die Bindung von 16 sauren und 11 basischen organischen Substanzen an Hämoglobininlösungen, die er durch Hämolyse menschlicher Erythrocyten mittels Ultraschall erhielt.

Bei seinen Experimenten, die er mittels Gleichgewichtsdialyse durchführte, fanden sich für die basischen Arzneimittel Bindungswerte zwischen 13,7 % und 96,7 %. Hilzenbecher führte aus, daß die Hämoglobinbindung pharmakokinetisch eigentlich bedeutender sei als die Bindung an Plasmaproteine, einfach deshalb, weil " der Hämoglobinanteil im gleichen Volumen Blut mehr als doppelt so groß ist wie der Anteil an Plasmaproteinen ", ähnliches vermuteten Jähnchen et al. (1971).

Natürlich kann die Bindung nur Bedeutung erlangen, wenn die Substanzen an den Bindungsort gelangen, d.h. durch die Erythrocytenmembran ins Zellinnere permeieren. Es ergibt sich somit die Frage, ob die von Hilzenbecher (1972) gefundenen Bindungswerte der Pharmaka an Hämoglobin unter physiologischen Bedingungen, das heißt an intakten Erythrocyten erreicht werden, also ob diese Substanzen die Zellmembran durchdringen.

Somit war es Aufgabe dieser Arbeit festzustellen, ob die basischen Substanzen, an den Hilzenbecher die Hämoglobinbindung bestimmt hat, durch die Erythrocytenmembran permeieren, sowie die Werte für die Hämoglobinbindung im Erythrocyten zu berechnen und mit denen Hilzenbechers (1972) zu vergleichen.

II) METHODIK

1) Herstellung des Erythrocytenkonzentrates

Als Ausgangsmaterial dienten Blutkonserven, die vor der Verarbeitung bis zu drei Wochen bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ gelagert worden waren (Blutbank Rasch, München). Dabei wurden, um individuelle Unterschiede weitgehend zu nivellieren, mehrere Konserven auf einmal verarbeitet. Um ein Erythrocytenkonzentrat zu erhalten, wurden das restliche Plasma sowie die Leukocyten- und Thrombocyten-schicht nach Zentrifugieren bei 2000xg abgesaugt.

Um dieses Konzentrat weitgehend von noch vorhandenen, nicht erwünschten Bestandteilen zu befreien, wurde es mit drei Teilen eines blutisotonen, $1/8$ molaren Phosphatpuffers vom pH 7,4 versetzt und 30 Minuten bei 2000xg zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurden

die Erythrocyten noch zweimal auf dieselbe Weise mit Puffer versetzt, abzentrifugiert und am Ende nach Entfernung des Überstands in 20 ml Zentrifugengläser gefüllt.

Um so wenig extrazelluläre Flüssigkeit wie möglich in dem Erythrocytenkonzentrat zu haben, wurde ein letztes Mal 15 Minuten bei 2000xg zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Injektionskanüle entfernt.

Die gewaschenen Erythrocyten wurden meist sofort verwendet, höchstens aber bis zu 24 Stunden bei + 4 ° C aufbewahrt, da sie bei längerem Stehenlassen zunehmend hämolysierten.

2) Herstellung der Erythrozytensuspension

Damit sich die Erythrozyten bei der Inkubation in möglichst physiologischem Milieu befinden und ihr Stoffwechsel nicht beeinträchtigt wird, wurde zum Erythrozytenkonzentrat die gleiche Menge einer isotonen Lösung nach Hanks (1949) gegeben. Der pH dieser Salzlösung (Zusammensetzung siehe Tab. 1) betrug 7,4, geringgradige Abweichungen wurden mit Na₂ HPO₄ - bzw. KH₂ PO₄ - Lösungen korrigiert.

Um den genauen Erythrozytenanteil dieser Suspension festzustellen, wurde ihr Hämatokrit durch 20 min langes Zentrifugieren bei 2000xg mit Yankee-Micro-Hematocrit-tubes bestimmt.

Die Feststellung der Hämoglobinkonzentration erfolgte nach Kurz und Waller (1955) durch photometrische Messung des mit Dithionit reduzierten Hämoglobins bei einer Wellenlänge von 555 nm, nachdem die Erythrozyten

durch Zugabe von Saponin zur Hämolyse gebracht worden waren.

Jeweils 10 ml der Erythrozytensuspension wurden in Zentrifugengläser gefüllt. Die Gläser wurden verschlossen, in ein Wasserbad gestellt und bei einer konstanten Temperatur von 37 ° C geschüttelt.

Tab. 1 : Zusammensetzung der isotonen Salzlösung
----- nach Hanks (1949), Angaben in Gramm/
Liter:

NaCl	8,00
KCl	0,40
CaCl ₂	0,14
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,10
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,10
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	0,06
KH ₂ PO ₄	0,06
Glucose	1,00
NaHCO ₃	0,35

3) Herstellung und Inkubation der Substanzlösungen

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden $1,5 \cdot 10^{-4} \text{m}$, blutisotone Lösungen vom pH 7,4 hergestellt. Als Lösungsmittel diente wieder der Puffer nach Hanks (1949), der pH-Wert wurde, wenn nötig, auf die gleiche Weise wie oben beschrieben korrigiert.

Für zwei Substanzen, Toloniumchlorid und Chlorimipramin, bei denen Bestimmungen auch bei den pH-Werten 6,8 und 8,0 durchgeführt wurden, wurde der pH der

Substanzlösung auf den entsprechenden Wert eingestellt, auch der pH-Wert der Erythrocytensuspension wurde auf diesen Wert korrigiert.

Jeweils 10 ml einer Lösung wurden in die Gläser mit Erythrocytensuspension im Wasserbad pipettiert, die Gläser über einen festgelegten Zeitraum, die Inkubationszeit, bei 37°C geschüttelt.

Die Inkubationszeiten lagen zwischen 120 Minuten und " 0 Minuten " (120 min., 60 min., 30 min., 15 min., 0 min.), wobei die letzte Angabe besagt, daß sofort nach dem Einpipettieren zentrifugiert wurde.

Nachdem sich die $1,5 \cdot 10^{-4}$ m Arzneimittellösung noch in den 5 ml Puffer der Erythrocytensuspension verteilen konnte, betrug die Konzentration der Substanz in der extrazellulären Flüssigkeit bei Beginn der Inkubationszeit 10^{-4} Mol/l . Hilzenbecher (1972) hatte bei seinen Versuchen mit denselben Substanzkonzentrationen gearbeitet.

Für jeden Inkubationszeitraum wurde der Blindwert der Erythrocytensuspension mitgemessen, auch der Blindwert der Arzneimittellösung wurde bestimmt.

Ebenso wurde eine Probe der gelösten Substanz ins Wasserbad gestellt, um festzustellen, ob sich das Arzneimittel etwa im Laufe der Zeit durch die Temperatureinwirkung verändert.

Nach Ablauf des Inkubationszeitraums wurden die Gläser unverzüglich 5 Minuten lang bei $2000 \times g$ zentrifugiert und die zur Analyse notwendigen Mengen Überstands abpipettiert.

Als Maß für den Grad der während der Inkubation erfolgten Hämolyse wurde die Hämoglobinkonzentration im Überstand

bestimmt. Dann wurde die abpipettierte Menge mit 2 Tropfen 20 % iger Trichloressigsäure versetzt und 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. So wurden die Hämoglobinbeimischungen entfernt, die wie sich zeigte zumindest bei einigen Substanzen den weiteren Analysengang störten.

4) Substanzen und Bestimmungsmethoden

Die Bestimmung der Substanzkonzentration im Überstand erfolgte photometrisch, wobei die Extinktion erst nach Abtrennung störender Beimengungen ohne zu große Streuung bestimmt werden konnte. Deshalb wurde die Substanz aus einer Probe des Überstandes nach Alkalisieren in ein Lipoidlösungsmittel extrahiert und anschließend in Säure reextrahiert.

In Tabelle 2 sind die untersuchten Substanzen mit ihrem Molekulargewicht und pK_a-Wert sowie ihre Konzentrationen in der extrazellulären Flüssigkeit bei Beginn der Inkubationszeit angegeben.

Es wurden folgende Nachweismethoden verwendet:

AMINOPHENAZON nach der Methode von Brodie und Axelrod (1950);

ANILIN nach der Methode von Bratton und Marshall (1939);

CHLORDIAZEPOXID nach der Methode von Bratton und Marshall (1939) modifiziert durch Beyer und Sadee (1969).

CHLORIMIPRAMIN, DESIPRAMIN, IMIPRAMIN wurden nach Alkalisieren mit 1 n NaOH in Petroläther extrahiert, anschließend in 0,1 n HCl reextrahiert und bei 250 nm

bestimmt;

CHLORPROMAZIN und PROMETHAZIN nach der Methode von Salzmann und Brodie (1956);

TOLONIUMCHLORID wurde nach Ansäuern mit 0,1 n HCl bei 595 nm gemessen.

Tabelle 2 : Zusammenstellung der untersuchten Substanzen. Dazu sind aufgeführt die Substanzkonzentrationen in der Flüssigkeit außerhalb der Erythrozyten bei Beginn der Inkubationszeit, sowie das Molekulargewicht und der pK_a -Wert.

Die Buchstaben hinter den pK_a -Werten beziehen sich auf die zitierte Literatur:

F: Angabe der Herstellerfirma

G: Green (1967)

M: Marshall (1955)

P: Perrin (1965)

S: Schanker et al. (1957)

Substanz	Konzentration (mg/ml)	Mol.Gew.	pK_a	
Aminophenazon	23,1	231	5,0	S
Anilin-HCl	12,9	129	4,6	S
Chlordiazepoxid-HCl	33,6	336	4,3	F
Chlorimipramin-HCl	35,1	351	7,96	F
Chlorpromazin-HCl	35,5	355	9,3	M
Desipramin-HCl	30,2	302	10,2	G
Imipramin-HCl	31,6	316	9,5	G
Promethazin-HCl	32,0	320	9,01	M
Toloniumchlorid	30,5	305	7,5	P

- 5) Berechnung des von den Erythrozyten aufgenommenen
Anteils der inkubierten Substanzmenge
(Erythrozytenbindung).

Die im Überstand gemessenen Extinktionen geben die Konzentrationen an, die zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Inkubation der Substanz im Raum außerhalb der Erythrozyten vorhanden sind. Dieser Wert wird mit c_t bezeichnet.

Sollte keine meßbare Menge Substanz in die Erythrozyten eingedrungen sein, sich die Substanz also nur im Extrazellulärraum verteilt haben, wäre die Konzentration $10^{-4}m$, sie entspräche also der Konzentration in der Lösung allein, von der ebenfalls eine Probe ins Wasserbad gestellt wurde. Der gemessene Wert dieser Probe wird mit c_{max} bezeichnet.

Eichkurven zeigten, daß in diesem Konzentrationsbereich das Lambert-Beersche Gesetz erfüllt ist; daher können die Konzentrationen durch die Extinktionen ausgedrückt werden.

Die Substanzmenge in den Erythrozyten beträgt:

$$1) m_i = m_{ges} - m_a$$

m_{ges} = Gesamtmenge der inkubierten Substanz

m_i = Substanzmenge in der Gesamtheit der Erythrozyten

m_a = Substanzmenge außerhalb der Erythrozyten

Die inkubierte Gesamtmenge errechnet sich aus der Formel:

$$2) \quad m_{\text{ges}} = c_{\text{max}} \cdot V_a$$

c_{max} = Konzentration der Substanz im Raum außerhalb der Erythrocyten bei Beginn der Inkubationszeit (in der Annahme, daß noch nichts von der Substanz in die Blutkörperchen eingedrungen ist)

V_a = Volumen der Außenflüssigkeit (15 ml);

Für die Substanzmenge außerhalb der Erythrocyten gilt:

$$3) \quad m_a = c_t \cdot V_a$$

c_t = Konzentration der Substanz im Überstand nach einem bestimmten Inkubationszeitraum

Setzt man die Gleichungen 2 und 3 in Gleichung 1 ein, so ergibt sich:

$$4) \quad m_i = V_a \cdot (c_{\text{max}} - c_t)$$

Die Erythrocytenbindung, d.h., der prozentuale Anteil der Gesamtmenge der Substanz, der sich in den Erythrocyten befindet, errechnet sich folgendermaßen:

$$5) \quad \alpha = \frac{m_i}{m_{\text{ges}}} \cdot 100$$

Nach dem Einsetzen der Gleichungen 2 und 4 in Gleichung 5 ergibt sich:

$$6) \quad \alpha = \left(1 - \frac{c_t}{c_{\text{max}}} \right) \cdot 100$$

- 6) Berechnung des an Hämoglobin gebundenen Anteils β der in die Erythrozyten eingedrungenen Substanzmenge.

Die Berechnung des an Hämoglobin gebundenen Anteils β erfolgte als Bruchteil der Substanzmenge, die sich in der Gesamtheit der Erythrozyten befindet.

Die gebundene Substanzmenge ergibt sich nach Abzug der im intrazellulären Wasser gelösten Substanzmenge von der Menge, die in die Erythrozyten eingedrungen ist:

- 7) -

$$m_{\text{geb}} = m_i - m_f$$

m_{geb} = an Hämoglobin gebundene Substanzmenge

m_f = im intrazellulären Wasser gelöste freie Substanzmenge

Für die im intrazellulären Wasser gelöste, freie Substanzmenge gilt, nachdem die Konzentrationen beiderseits der Membran übereinstimmen (unter Vernachlässigung des Donnan-Effektes).

- 8) $m_v = c_t \cdot V_i$

V_i = Volumen des Erythrozytenwassers

Schanker (1961) bestimmte den Wassergehalt der Erythrozyten mit 66 %, einem Wert, der mit unseren Messungen übereinstimmt:

Es wurde eine bestimmte Menge Erythrozytenkonzentrats gewogen, darauf in Trockenschrank und Exsikkator

getrocknet und wieder gewogen. Der Gewichtsverlust betrug 66 % des Ausgangswertes.

Für den gebundenen Anteil B gilt:

$$9) \quad B = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \cdot 100$$

Nach Einsetzen von Gleichung 4 in Gleichung 9 ergibt sich:

$$10) \quad B = \left(1 - \frac{V_i \cdot c_t}{V_a (c_{\max} - c_t)} \right) \cdot 100$$

III ERGEBNISSE

Die Abbildungen 1 u. 2 geben Aufschluß sowohl über den prozentualen Anteil der Substanz, der in die Erythrocyten eingedrungen ist (Erythrocytenbindung), als auch über die Geschwindigkeit, mit der die Permeation erfolgte.

Es zeigt sich, daß die Gleichgewichtseinstellung sehr schnell vor sich ging, schon beim Inkubationszeitraum " 0 Minuten ", bei dem die Erythrocyten nur während des etwa 5 Min. dauernden Zentrifugierens mit der Substanz in Kontakt waren, war die EndEinstellung in allen Fällen erreicht.

Der Anteil, der in die Erythrocyten eingedrungen war, reicht von 26,2 % bei Aminophenazon, bis zu 93,9 % bei Chlorimipramin.

In Tab. 3 sind Erythrozytenbindung sowie Hämoglobinbindung für 7 Substanzen aufgeführt: Den hier errechneten Werten werden diejenigen Hilzenbechers (1972) gegenübergestellt.

Die Hämoglobinbindung bei den intakten Erythrozyten liegt dabei durchwegs höher als bei homogenisierten Zellen. Die niedrigste Bindung weist Aminophenazon mit 38,0 % auf, am höchsten sind Chlorpromazin mit 97,6 % und Chlorimipramin mit 98,2 % gebunden. Bei der Berechnung dieser Werte wurde der Donnan-Effekt berücksichtigt.

Die Werte der Substanzen Chlorimipramin und Toloniumchlorid, die bei 3 verschiedenen pH-Werten ermittelt wurden, sind in den Abbildungen 3 und 4 sowie in Tab. 4 berücksichtigt. Dabei scheint es so zu sein, daß bei Toloniumchlorid bei allen 3 pH-Werten im Laufe der Inkubationszeit die Erythrozytenbindung abnimmt, was bei Chlorimipramin, nur bei pH 6,8 der Fall ist. Im übrigen kommt es zu keiner sichtbaren Verlangsamung der Permeationsgeschwindigkeit, die Substanzen haben bei allen pH-Werten innerhalb der 5 min langen Zentrifugationszeit ihre Maximalkonzentration innerhalb der Erythrozyten erreicht.

Die Erythrozytenbindung, d.h. der Anteil der Substanzen, der in die Erythrozyten eingedrungen ist, steigt bei Toloniumchlorid bei pH-Änderung von 6,8 auf 8,0 um 10,8 % auf 89,2 % an, bei Chlorimipramin beträgt die Steigerung 2,8 % (90,9 auf 93,7).

Die Bindung an Hämoglobin ändert sich dabei bei Chlorimipramin nicht wesentlich, bei Toloniumchlorid nimmt sie von pH 6,8 zu pH 8,0 um 3 % zu.

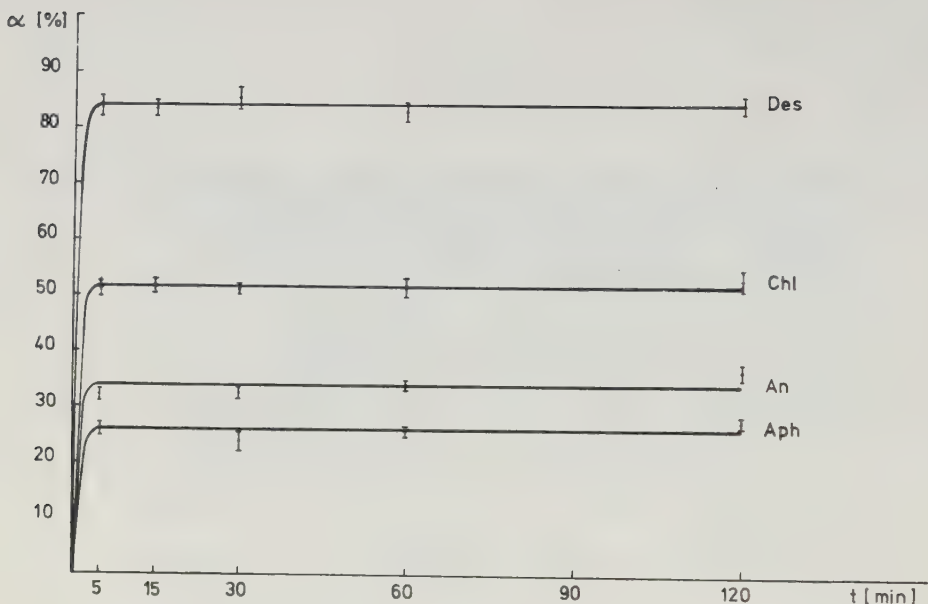


Abb. 1: Permeationsgeschwindigkeit und Erythrocytenbindg. von Desipramin (Des), Chlordiazepoxid (Chl), Anilin (An), Aminophenazon (Aph). Auf der Abszisse ist die Inkubationszeit aufgetragen, auf der Ordinate die Erythrocytenbindung mit der Streuung des Mittelwertes.

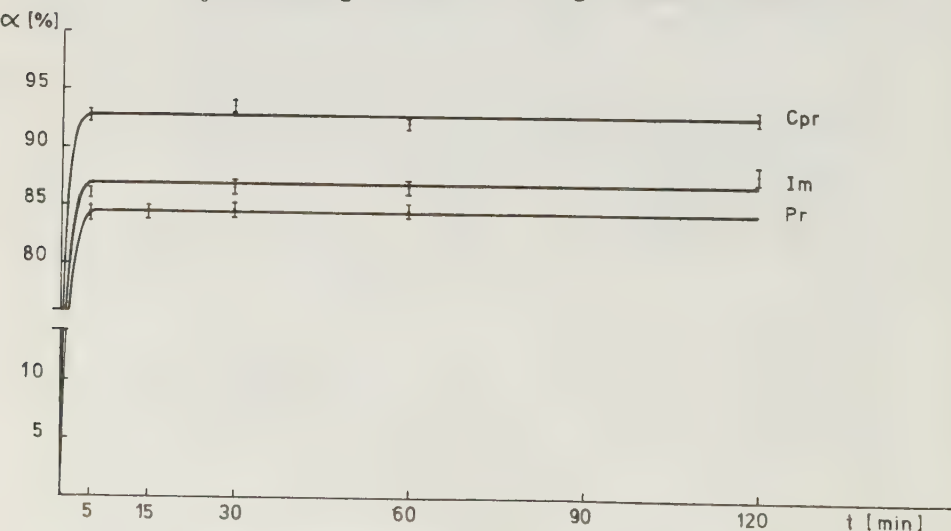


Abb. 2: Permeationsgeschwindigkeit und Erythrocytenbindung (mit Streuung des Mittelwertes) von Chlorpromazin (Cpr), Imipramin (Im) und Promethazin (Pr).

Substanz	Anzahl d. Messungen	Erythro- cytenbindg. $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (%)	Hämoglobin- bindung $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (%)	Hämoglobinbindg. Hilzenbecher (1972) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (%)	% ionisiert bei pH 7,4
Aminophenazon	10	26,2 $\pm$ 0,3	38,0 $\pm$ 1,0	13,7 $\pm$ 1,8	0,39
Anilin	10	34,1 $\pm$ 0,4	57,5 $\pm$ 0,7	53,0 $\pm$ 0,5	0,16
Chlordiazepoxid	10	51,7 $\pm$ 0,3	79,4 $\pm$ 0,3	75,5 $\pm$ 1,4	0,079
Chlorpromazin	14	92,7 $\pm$ 0,2	97,6 $\pm$ 0,1	96,7 $\pm$ 0,1	98,76
Desipramin	12	83,9 $\pm$ 0,1	94,2 $\pm$ 0,3	86,3 $\pm$ 0,9	99,84
Imipramin	10	86,8 $\pm$ 0,2	95,4 $\pm$ 0,1	86,5 $\pm$ 0,1	99,21
Promethazin	10	84,4 $\pm$ 0,2	94,6 $\pm$ 0,1	90,7 $\pm$ 0,2	97,60

Tab. 3: Zusammenstellung der Erythrocytenbindung sowie der Hämoglobinbindung mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Daneben sind aufgeführt die Anzahl der Messungen, die von Hilzenbecher (1972) gefundenen Bindungswerte sowie die Ionisationsgrade der Substanzen bei pH 7,4.

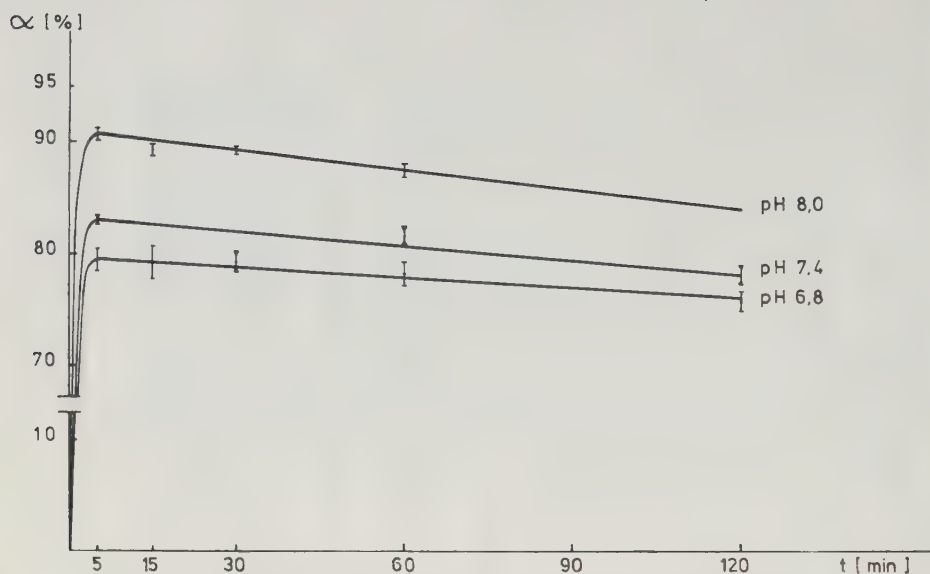


Abb. 3: Permeationsgeschwindigkeit und Erythrocytenbindung von Toloniumchlorid bei pH 8, pH 7,4 und pH 6,8. Angegeben ist die Streuung des Mittelwertes.

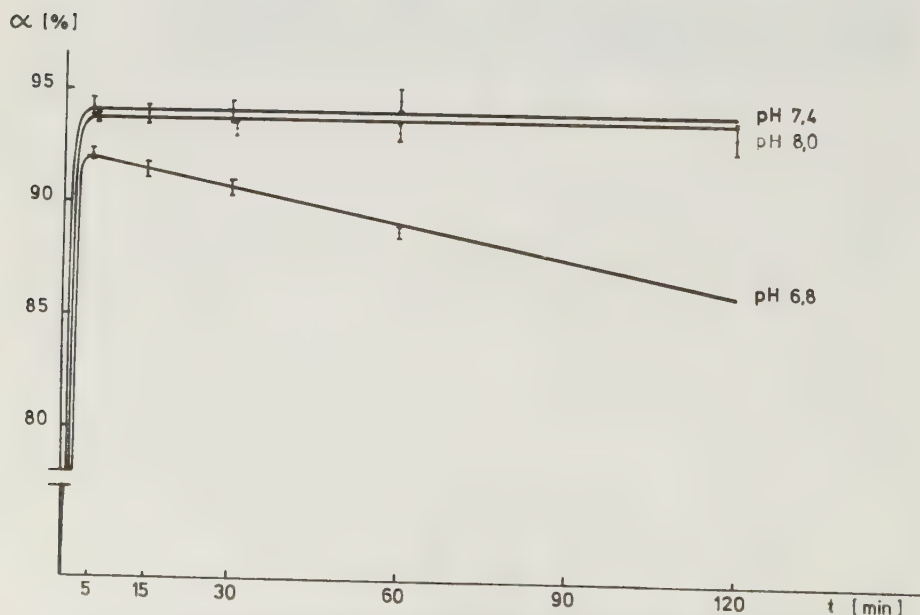


Abb. 4: Permeationsgeschwindigkeit und Erythrocytenbindung (mit Streuung des Mittelwertes) von Chlorimipramin bei pH 8, pH 7,4 und pH 6,8.

Substanz	pH	Anzahl der Messungen	Erythrocyten- bindung $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (%)	Hämoglo- binbindg. $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (%)	Hämoglobinbindg. Hilzenbecher (1972) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (%)	% ioni- siert
Tolonium- chlorid	6,8	12	78,4 $\pm$ 0,6	93,7 $\pm$ 0,2		83,87
	7,4	17	80,4 $\pm$ 0,6	93,5 $\pm$ 0,2	83,9 $\pm$ 0,2	55,73
	8,0	12	89,2 $\pm$ 0,4	96,7 $\pm$ 0,1		24,03
Chlorimi- pramin	6,8	10	90,9 $\pm$ 0,3	97,6 $\pm$ 0,1		93,50
	7,4	10	93,9 $\pm$ 0,2	98,2 $\pm$ 0,1	95,3 $\pm$ 0,3	78,35
	8,0	10	93,7 $\pm$ 0,1	97,8 $\pm$ 0,1		50

Tab. 4: Zusammenstellung der Erythrocytenbindung und der Hämoglobinbindung mit Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) bei Toloniumchlorid und Chlorimipramin jeweils bei 3 verschiedenen pH-Werten. Dazu sind die Anzahl der Messungen, die Bindungswerte Hilzenbechers (1972) sowie der Ionisationsgrad der 2 Substanzen bei den verschiedenen pH-Werten aufgeführt.

DISKUSSION

A) zur Methodik

Orzechowski (1930) bestimmte die Verteilung von Farbstoffen auf gewaschene Erythrozyten, indem er den Farbstoff zusetzte und nach Zentrifugation seine Konzentration im Überstand maß. Auch wir gingen nach dieser Methode vor, die im wesentlichen folgende Fehlermöglichkeiten bietet:

1) Bindung an Moleküle im Extrazellulärraum

Falls sich im Extrazellulärraum Proteine befinden, an die die einpipettierte Substanz gebunden wird, so verschiebt sich das Gleichgewicht, es wird nicht mehr soviel Substanz in die Erythrozyten eindringen wie bei einem proteinfreien Außenmedium. Diese Verunreinigungen wären denkbar bei unzureichendem Waschvorgang sowie durch Hämolyse, die während der Inkubationszeit zu einem Austritt von Hämoglobin aus den roten Blutkörperchen führte.

Da diese Proteinbeimengungen durch Zugabe von Trichloressigsäure gefällt wurden, lieferte die Menge des Bodensatzes nach dem Zentrifugieren ein gutes Bild von der Menge extrazellulären Proteins:

Es zeigte sich, daß die Hauptfehlerquelle die Hämolyse bildete, die nach dem Waschen eintrat und von der Aufbewahrungsdauer der Erythrozyten abhing:

Standen diese länger als 24 Stunden bei $+ 4^{\circ}$ im Kühlschrank, stieg der Hämoglobingehalt im Überstand, kenntlich an der Rotfärbung, deutlich an.

Jedoch auch bei sehr starker Färbung - diese Proben wurden nicht mehr verwendet - überstieg die Hämoglobin-

konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit nie 1 % der Gesamthämoglobinkonzentration der Erythrocytensuspension.

Da die Aufenthaltsdauer der Erythrocyten im Wasserbad für die verschiedenen Inkubationszeiten gleich lang war, konnte die mechanische (schütteln) und thermische (37°) " Belastung " zu keiner unterschiedlichen Hämolyserate führen. Wohl aber könnte es durch die längere Einwirkungszeit verschiedener Substanzen auf die Blutkörperchen zu verstärkter Hämolyse kommen. So berichten Seeman und Bialy (1963) und Seemann et al. (1969) über hämolytische Aktivitäten von Chlorpromazin bei Konzentrationen über $4 \cdot 10^{-5}$ M.

Ahtee und Paasonen (1966) fanden, daß während der 1. Stunde der Inkubationszeit der Gehalt von Chlorpromazin in den Erythrozyten abnahm: Diese Autoren führen diese Beobachtung auf eine durch das Pharmakon verursachte Zellschädigung zurück.

Aus unseren Hämoglobinbestimmungen im Überstand ließ sich jedoch weder für Chlorpromazin noch für eine andere Substanz ein durch längere Einwirkungsdauer verstärkter Blutkörperchenzerfall finden.

Auch bei Toloniumchlorid, bei dem bei allen 3 pH-Werten der intraerythrocytäre Anteil im Laufe der Inkubationszeit abnimmt, also das Pharmakon wieder aus den Erythrocyten austritt, ließ sich eine vermehrte Hämolyse nicht nachweisen.

Auffällig ist, daß das Austreten bereits an die roten Blutkörperchen gebundener Substanz nur bei Toloniumchlorid vor allem bei pH 6,8 und pH 8, Imipramin bei pH 6,8 auftritt: Es wäre möglich, daß die pH-Belastung bei diesen beiden Substanzen zu

Hämolyse und damit zu dieser Erscheinung führt: Erythrocyten quellen nämlich in saurem und schrumpfen in alkalischem Milieu (Modrzejewski u. Truchan - Rygiel 1970), so daß vor allem bei niedrigem pH die osmotische Fragilität erhöht wird (Murphy 1969).

2) Adsorption an die Membran

Es wäre vorstellbar, daß der aus dem Überstand verschwundene Substanzanteil nicht in die Erythrocyten eingedrungen ist, es nur zu einer Adsorption an die Membran kam. So berichten Kwant und Seeman (1969) über einen membranexpandierenden Effekt von Chlorpromazin, der auf die Adsorption des Arzneimittels zurückzuführen sei.

Jähnchen et al. (1971) schlossen aus Versuchen, die sie mit einem Perfusionsmedium aus 2 % Albumin und 30 % Rindererythrocyten an Rattenleber durchführten, daß wegen der raschen Mobilisierbarkeit des an die Erythrocyten gebundenen Anteils von Promazin und Chlorpromazin diese Substanzen nur an die Oberfläche der Blutkörperchen gebunden sein könnten. Auch Toyka (1974) fand eine Bindung von Chlorpromazin an isolierte Membranen (sie betrug 34 %), sie konnte jedoch zeigen, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Hämoglobin die Bindung an die Membranen vernachlässigt werden kann. Dieses Phänomen führt Toyka auf eine geringere Bindungsaffinität von Chlorpromazin an die Membranen zurück.

Bei Menadion fanden Mezick et al. (1970) sogar eine irreversible Bindung an " ghosts " .

Schanker et al. (1961) untersuchten die Bindung

von p-Nitroanilin, Äthylenglykol und Serotonin an Membrantrümmer: Während sich für Äthylenglykol und Serotonin keine Bindung feststellen ließ, wurde p-Nitroanilin bis zu 3 % an die Membranen gebunden. Für Isoproterenol konnten Kübler und Männl (1970), ebenso wie Maren et al. (1960) für Azetazolamid keine Adsorption an die Erythrocytenmembran finden. Insgesamt läßt sich feststellen, daß manche Substanzen in unterschiedlichem Ausmaß an Erythrocytenmembranen gebunden werden. Jedoch sind diese Ergebnisse wenig aussagekräftig, da sie an isolierten Membrantrümmern gewonnen wurden, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Hämoglobin scheint die Bindung an die Membran kaum eine Rolle zu spielen.

3) Fehler bei der Berechnung der Hämoglobinbindung

Will man die Bindung der Substanzen an Hämoglobin berechnen, stößt man auf folgende Probleme:

a) Verteilungsraum für die Substanz im intrazellulären Wasser.

Während sich der extrazelluläre Verteilungsraum für die Substanz genau bestimmen läßt (er beträgt 15 ml bei einem Hämatokrit in der Erythrocytensuspension von $49,9 \pm 0,3$), ergeben sich bei der Festsetzung des intrazellulären Verteilungsraumes Probleme. Erstens schwanken die Angaben über den Wassergehalt der Erythrocyten: So geht Hutchinson (1952) von 71,5 % aus, Kübler und Männl (1970) nehmen gar einen Wassergehalt von 80 % an. Bei unseren Bestimmungen wurden 66 % errechnet, denselben Wert erhielt

Schanker (1961) bei seinen Messungen. Zweitens stellt sich die Frage, ob das gesamte intrazelluläre Wasser zur Lösung der Substanzen zur Verfügung steht. Hutchinson (1952) kommt, zum Teil zurückgreifend auf Versuche von Hill (1930), Mc Kay (1932), sowie Ponder und MacLeod (1936), zu dem Ergebnis, daß das gesamte Erythrocytenwasser " frei " sei, das heißt als Lösungsraum für niedermolekulare Stoffe dienen könne.

b) Berücksichtigung des Donnan-Effekts

Nachdem bei unseren Versuchen Ionen auf einer Seite einer Membran sind, die diese Membran nicht durchdringen können (nämlich die bei pH 7,4 teilweise geladenen Hämoglobinmoleküle im Erythrocyteninneren), kommt es zur Ausbildung eines Donnan-Gleichgewichtes, da die Verteilung anderer diffusibler Ionen (auch geladener Substanzmoleküle) nicht unbeeinflusst erfolgen kann. Um die Größe des Donnanfaktors r zu errechnen, gingen wir nach van Slyke et al. (1923) und Henderson et al. (1924) vor. Diese wählten das Wasserstoffion als " Modellion " für die Verteilung der diffusiblen Ionen. Es ergibt sich:

$$r = \frac{H^+_a}{H^+_i} = \frac{Kat^+_a}{Kat^+_i}$$

H^+ : Wasserstoffionenkonzentration innerhalb (i) bzw. außerhalb (a) der Erythrozyten.

Kat^+ : Konzentration der diffusiblen Kationen innerhalb (i) bzw. außerhalb (a) der Erythrocyten.

Durch Umformung erhält man:

$$\log r = \text{pH}_i - \text{pH}_a$$

pH_i = intrazellulärer pH

pH_a = im Außenmedium (7,4)

Substanz	Bindung mit Berücksichtigung des Donnaneffekts	Bindung ohne Berücksichtigung des Donnan-effekts
Desipramin	94,2 ± 0,3	95,8 ± 0,3
Chlorimipramin	98,2 ± 0,1	98,6 ± 0,1
Chlorpromazin	97,6 ± 0,1	98,3 ± 0,1
Imipramin	95,4 ± 0,1	96,4 ± 0,1
Promethazin	94,6 ± 0,1	95,9 ± 0,1
Toloniumchlorid	93,5 ± 0,2	94,6 ± 0,2

Tab.5 : Bindungswerte für 6 Substanzen mit und ohne Berücksichtigung des Donnan-Effekts.

Die Bindungswerte der anderen 3 Arzneimittel werden von der Donnan-Verteilung nicht beeinflusst, da diese beim pH 7,4 nur zum geringen Teil ionisiert sind.

Bei den Ergebnissen werden die korrigierten Werte verwendet.

Bei einem intrazellulären pH von 7,26 (van Slyke et al. 1923, Schanker 1961) errechnet sich r mit 0,71. Somit gilt, daß das Konzentrationsverhältnis der diffusiblen Anionen (auch der geladenen Substanzmoleküle) zwischen Zellinnerem und Außenmedium

0,71 beträgt.

Nun beeinflußt der Donnan-Effekt nur ungebundene und geladene Moleküle. Somit ist ein Einfluß von r am ehesten bei stark dissoziierten Substanzen mit niedriger Bindung zu erwarten. Da unter den untersuchten Substanzen keine mit beiden Eigenschaften war (s.Tab. 3 u. 4), änderten sich die Bindungswerte nur wenig. 6 Bindungswerte lagen bei Berücksichtigung des Donnan-Effekts niedriger, die deutlichste Veränderung trat bei Desipramin mit 1,6 % auf. In Tabelle 5 sind die Bindungen mit und ohne Berücksichtigung des Donnan-Effekts aufgeführt.

B) Zu den Ergebnissen

1) Die Permeation der Substanzen in die Erythrozyten

Bei allen untersuchten Substanzen zeigte sich, daß ihre Permeation in die Erythrozyten zu schnell erfolgte, um mit der angewendeten Methode zeitlich verfolgt werden zu können. Gleiches beobachteten Freeman und Spirtes (1963) für Chlorpromazin und Sgaragli und Zilletti (1970) für Gamma-butyrolactone. Eine pH-Änderung auf 6,8 und damit eine Zunahme des Ionisationsgrades bei 2 Substanzen hatte keine feststellbare Verlangsamung der Eindringgeschwindigkeit zur Folge. Auch Schanker et al. (1961) fanden, daß die Gleichgewichtseinstellung zwischen Erythrozyteninnerem und Außenmedium für einige basische Substanzen, unter ihnen Anilin, in weniger als 5 min (nämlich der Zeit, die fürs Zentrifugieren benötigt wird) erfolgt. Es stellte sich heraus, daß die Permeationsgeschwindigkeit positiv korreliert war mit den Verteilungskoeffizienten der Substanzen zwischen

Äthylacetat und Wasser bzw. Chloroform und Wasser. Unter den sehr schnell eindringenden Kationen hatte dabei Bufotenin mit 0,0156 den niedrigsten Verteilungskoeffizienten zwischen Chloroform und Wasser.

Zum Vergleich: Unter den von uns untersuchten Substanzen war Aminophenazon am schlechtesten lipidlöslich; der Verteilungskoeffizient Chloroform/Wasser beträgt für Aminophenazon 140.804 (Appiah 1971). Somit überrascht es nach den Ergebnissen Schankers et al. (1961, 1964) nicht, wenn die hier verwendeten, relativ gut lipidlöslichen Pharmaka bei der angewendeten Methode unmeßbar schnell in die Erythrozyten eindringen.

2) Die Bindung der Substanzen an Hämoglobin

Würden sich die Substanzen nur im Intrazellulär-
raum verteilen und es zu keiner Bindung an Hämoglobin oder andere Erythrozytenbestandteile kommen, würde die Ausgangskonzentration um 18 % abnehmen. Da sich die geringste Abnahme mit 26,2 % bei Aminophenazon zeigte, wurden alle Pharmaka gebunden. Nachdem 90-95 % der festen Erythrozytenbestandteile vom Hämoglobin gebildet werden (Houssay 1955), und die Membranbindung keine wesentliche Rolle spielt, bietet sich das Hämoglobinmolekül als Bindungsort an.

a) Abhängigkeit der Hämoglobinbindung von der Lipidlöslichkeit der Substanzen

Eine Reihe von Autoren betonte die Bedeutung des hydrophoben Charakters der Substanzen für die

Proteinbindung (Bird u. Marshall, 1967; Glasser u. Krieglstein, 1970; Hansch et al., 1965; Kiehs et al., 1966; Scholtan, 1964 und 1968). Dabei sei eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus einer Größe der Eiweißbindung und dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten nur innerhalb einer einheitlichen Substanzgruppe zu erwarten (Scholtan 1968).

Tab. 6: Verteilungskoeffizienten in den Systemen Oktanol/Wasser und Heptan/Wasser bei pH 7,4

Substanz	Verteilungsk. Oktanol/Wasser	Verteilungsk. Heptan/Wasser
Aminophenazon	6,446 $\pm$ 0,099 A	0,21 B
Anilin		1,1 B
Chlordiazepoxid	315 $\pm$ 7 M	
Chlorimipramin	2105 $\pm$ 157 G	970
Chlorpromazin	1814 $\pm$ 107 G	350
Desipramin	30 $\pm$ 1 G	7,05
Imipramin	327 $\pm$ 11 G	
Promethazin	473,9	266

A = Appiah (1971)

B = Brodie et al. (1960)

G = Glasser u. Krieglstein (1970)

M = Müller u. Wollert (1973)

In Tab. 6 sieht man die Substanzen mit ihren Verteilungskoeffizienten im System Oktanol/Wasser und im System Heptan/Wasser. In den Abbildungen 5 und 6

sind auf den Abszissen die Logarithmen der Verteilungskoeffizienten zwischen Oktanol und Wasser bzw. Heptan und Wasser aufgetragen und in Beziehung gesetzt zum Logarithmus des Quotienten aus gebundenem und freiem Anteil, welcher nach Bird und Marshall (1967) die besten Ergebnisse für diese Korrelation liefert.

Dabei ergaben sich recht hohe Werte:

Für sieben Substanzen (es fehlen Anilin und Toluoniumchlorid) ergibt sich für die Beziehung zwischen dem Logarithmus aus gebundenem und freiem Anteil und dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten der Substanzen in Oktanol/Wasser ein Korrelationskoeffizient (Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson) von 0,812, für sechs Substanzen (es fehlen Chlordiazepoxid, Imipramin und Toloniumchlorid) errechnet sich für die Korrelation von $\log B/F$ und $\log$ des Verteilungskoeffizienten in Heptan/Wasser ein Koeffizient von 0,937. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman beträgt bei Oktanol 0,893, bei Heptan sogar 1.

Es zeigen sich also relativ hohe Korrelationswerte in Anbetracht der Tatsache, daß es sich nicht um eine einheitliche Substanzgruppe handelt. Dies läßt sich wohl aus der Strukturähnlichkeit der untersuchten Pharmaka erklären: Sämtliche Substanzen sind Aromaten, sechs besitzen ein ähnliches tricyclisches Ringsystem.

Jedoch überrascht, daß die Korrelation für Heptan besser ist als für Oktanol: Appiah (1971) fand, daß

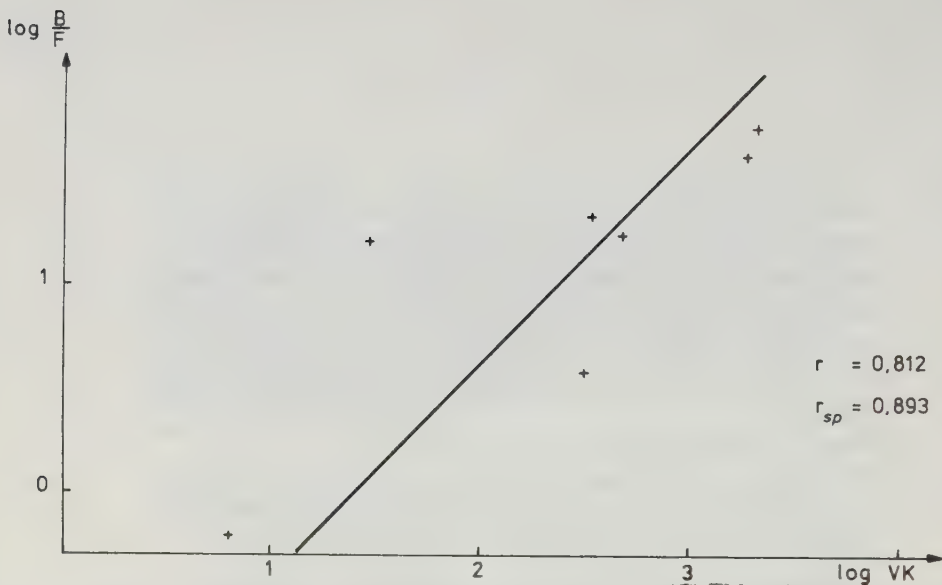


Abb. 5: Beziehung zwischen dem Log. des Verteilungskoeffizienten im System Oktanol/Wasser und dem Log. des Quotienten aus gebundenem und freiem Anteil. 7 Substanzen sind berücksichtigt.

r = Korrelationskoeffizient

r_{sp} = Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

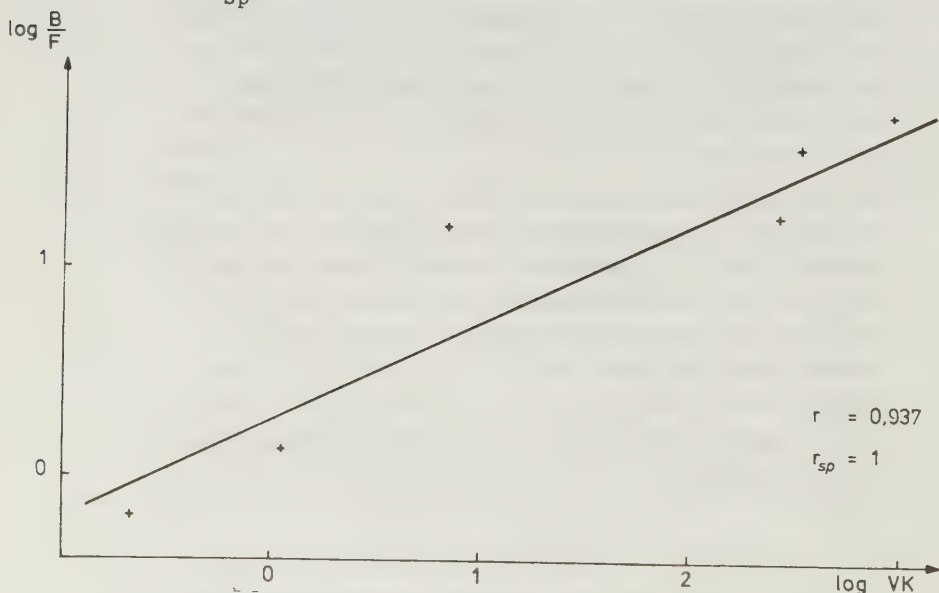


Abb. 6: Beziehung zwischen dem Log. des VK: im System Heptan/Wasser und dem Log. des Quotienten aus gebundenem und freiem Anteil. 6 Substanzen sind berücksichtigt.

r = Korrelationsk. r_{sp} = Rangkorrelationsk.

bei der Beziehung zwischen der Proteinbindung von Arzneimitteln und ihrer Verteilung in verschiedenen Lipoid/Wasser-Modellen die Korrelation bei polaren Lösungsmitteln (etwa Oktanol) besser ist als bei weniger polaren (etwa Heptan). Auch Hansch et al. (1962), sowie Kiehs et al. (1966) bei der Bindung organischer Substanzen an Rinderhämoglobin, erzielten die besten Korrelationen, wenn als Lipoidphase Oktanol verwendet wurde.

Scholtan (1964) nimmt bei der Bindung von Sulfonamiden an Eiweißkörper an, daß ionogene und hydrophobe Bindungen nebeneinander vorliegen. Appiah (1971) vermutet nun, daß die bessere Korrelation bei den polaren Lösungsmitteln bedingt ist durch die Rolle der ionogenen Bindung bei der Proteinbindung. Also würden die höheren Verteilungskoeffizienten bei Heptan für die hier untersuchten Substanzen bedeuten, daß die ionogene Bindung in den Hintergrund tritt, die hydrophobe Bindung im Vordergrund steht.

b) Abhängigkeit der Hämoglobinbindung vom Ionisationsgrad der Substanzen.

Weiter stellt sich die Frage, inwieweit die Hämoglobinbindung abhängig ist vom Ionisationsgrad der Substanzen. Hilzenbecher (1972) fand beim Vergleich der Plasma- und der Hämoglobinbindung mit dem Ionisationsgrad keine Gesetzmäßigkeit, Fichtl (1974) stellte bei der Muskelbindung von sieben positiv geladenen Substanzen eine positive Korrelation mit dem Ionisationsgrad fest, der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman betrug 0,750.

Bei den hier untersuchten Pharmaka reichte der

ionisierte Anteil bei pH 7,4 von 0,079 % (Chlordiazepoxid) bis 99,84 % (Desipramin), die Beziehung mit der Hämoglobinbindung ergab einen Rangkorrelationskoeffizienten von 0,667. Da jedoch die Ionisationsgrade bis auf zwei Werte im " Extrembereich " liegen (drei Substanzen unter 0,4 %, 4 Substanzen über 97,6 %, siehe dazu Tab. 3 u. 4), läßt sich aus dieser Zahl nicht entscheiden, ob die Ionisation die Bindung an Hämoglobin beeinflusst.

c) Vergleich der hier gefundenen Bindungswerte mit den Ergebnissen anderer Autoren

Vergleicht man die Bindung der untersuchten neun Substanzen mit den von Hilzenbecher (1972) gefundenen Werten, so ergibt sich hinsichtlich der Rangfolge weitgehende Übereinstimmung:

Einen Platztausch gab es zwischen Imipramin und Promethazin, sowie zwischen Chlorimipramin und Chlorpromazin (siehe Tab. 3 u. 4). Beim Vergleich der Bindungsrangfolgen ergibt sich ein Rangkorrelationskoeffizient von 0,967.

Hilzenbechers (1972) Bindungswerte liegen durchwegs niedriger, was auf den ersten Blick nicht verwundert, da er aus methodischen Gründen eine Hämoglobinkonzentration von 25 g/100 ml wählte, während die mittlere Hämoglobinkonzentration menschlicher Erythrozyten bei 31-35 g % liegt (Siegenthaler 1970).

Zwar argumentiert Hilzenbecher an Hand einer Bindungskurve von Sulfadimethoxin bei verschiedenen Hämoglobinkonzentrationen, daß über 20 g % die Bindung nur noch geringfügig zunähme, jedoch läßt sich wohl

ein gewisser Anteil der bei intakten Erythrozyten gemessenen höheren Bindung auf die höhere Hämoglobinkonzentration zurückführen.

Dabei ist die Bindungsdifferenz bei den einzelnen Substanzen sehr verschieden; Am größten ist der Unterschied mit 24,3 % bei Aminophenazon, am kleinsten mit 0,9 % bei Chlorpromazin. Diese verschiedenen hohen Bindungsdifferenzen könnten darauf zurückzuführen sein, daß die von der Hämoglobinkonzentration abhängigen Bindungskurven bei den einzelnen Substanzen unterschiedlich verlaufen, bei 25 g % in einigen Fällen noch nicht der flache Teil der Kurve erreicht ist.

Andererseits fällt beim Vergleich der Bindungsunterschiede mit der Lipoidlöslichkeit der Substanzen die hohe negative Korrelation auf: Das am schlechtesten lipoidlösliche Aminophenazon zeigt den größten Bindungsunterschied, die am besten lipoidlöslichen Chlorpromazin und Chlorimipramin weisen die geringsten Differenzen auf. In Abbildung 7 ist die Beziehung zwischen dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in Oktanol/Wasser und dem Logarithmus des Bindungsunterschieds bei sieben Pharmaka dargestellt: Man erkennt die negative Korrelation, der Korrelationskoeffizient beträgt - 0,870.

Dieser Befund könnte mit Schankers (1961) Beobachtung zusammenhängen, der fand, daß die Bindung von Serotonin an homogenisierte Erythrozyten nur ungefähr 80 % der Bindung an intakte Zellen beträgt, daß also mit Zerstörung der Erythrozyten die Bindung abnimmt. Da der Unterschied zwischen intakten und zer-

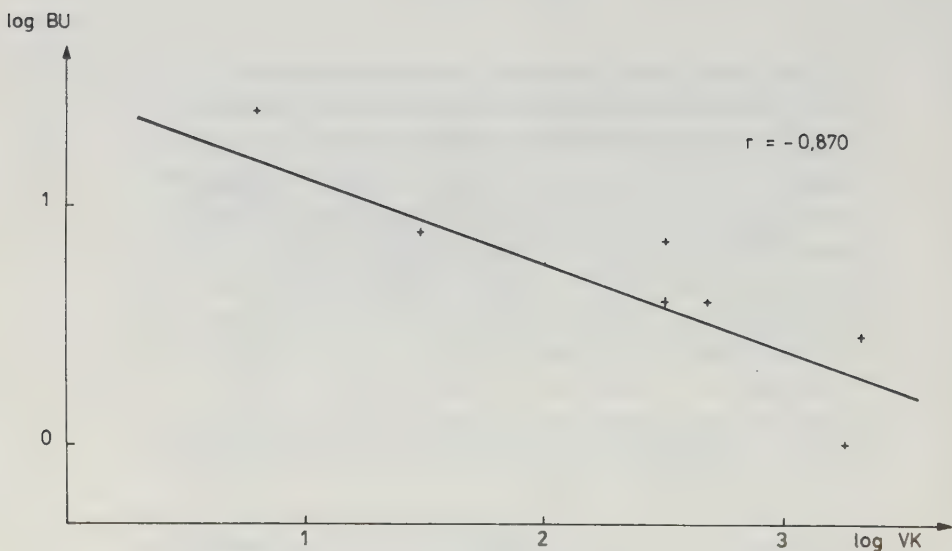


Abb. 7: Auf der Abszisse aufgetragen der Logarithmus der Verteilungskoeffizienten der Substanzen im System Oktanol/Wasser, auf der Ordinate der Logarithmus der Differenz in der Hämoglobinbindung zwischen den hier erhaltenen Werten und denen Hilzen - bechers (1972).
Eingezeichnet ist die Regressionsgerade.
 r = Korrelationskoeffizient.

störten Zellen in der Unversehrtheit der Zellmembran besteht (die chemische Zusammensetzung bleibt ja gleich), wäre zu vermuten, daß bei unbeschädigten Zellen bei bestimmten Substanzen eine Adsorption an die unversehrte Membranoberfläche stattfindet. Es scheint sich hierbei um keine chemische Bindung zu handeln, da etwa Serotonin von isolierten Membrantrümmern nicht gebunden wird (Schanker 1961).

Ferner wird diese Adsorption anscheinend durch hohe Wasserlöslichkeit begünstigt, was ersichtlich ist aus der Korrelation in Abbildung 7 und aus Schankers (1961) Ergebnissen, der die Bindungsdifferenz bei dem hydrophilen Serotonin, nicht aber bei dem hydrophoben p-Nitroanilin fand.

d) pH-Abhängigkeit der Hämoglobinbindung

Bei zwei Substanzen, Chlorimipramin und Toloniumchlorid wurden Eindringgeschwindigkeit und Hämoglobinbindung auch bei pH 6,8 und pH 8,0 bestimmt. Diese beiden Pharmaka wurden gewählt, weil ihre pK -Werte mit 7,96 bzw. 7,5 (siehe Tab. 2) so liegen, daß sich bei einer Abweichung des pH-Wertes von 7,4 die Ionisationsgrade deutlich verändern: In Tab. 4 sind die Ionisationsgrade der Substanzen bei den verschiedenen pH-Werten dargestellt. Ferner ersieht man den Anteil, der in die Erythrocyten eingedrungen ist, sowie die Höhe der Hämoglobinbindung.

Die Änderung des Ionisationsgrades beeinflusste die Eindringgeschwindigkeit der Pharmaka in die Erythrocyten nicht, jedenfalls konnte in der minimal meßbaren Zeit keine Permeationsverlangsamung festge-

stellt werden (siehe Abb. 3 u. 4).

Es ändert sich jedoch der Substanzanteil, der in die Zellen eindrang: Bei Chlorimipramin betrug dieser Anteil bei pH 6,8 etwa 3 % weniger als bei pH 7,4 und pH 8,0, bei Toloniumchlorid permeieren bei pH 7,4 2 % der Substanzmenge mehr als bei pH 6,8 und bei pH 8,0 8,8 % mehr als bei pH 7,4.

Berücksichtigt man bei der Berechnung der Bindung den Donnan-Effekt, so ergibt sich im vorliegenden pH-Bereich nur bei Toloniumchlorid eine wesentliche Veränderung der Bindung: Diese Substanz ist bei pH 8 etwa um 3 % höher gebunden als bei pH 6,8 und pH 7,4. Bei Chlorimipramin ändert sich die Bindung bei den verschiedenen pH-Werten kaum.

Erythrozyten quellen in saurem und schrumpfen in alkalischem Milieu (Modrzejewski u. Truchan - Rygiel 1970). Nach Murphy (1969) kommt es bei einer Abnahme des pH von 8,0 auf 6,2 zu einer Zunahme des Zellvolumens um 13 %, zu einer Zunahme des Zellwassers um 20 %. Folglich liegen die Bindungswerte für pH 6,8 etwas niedriger, für pH 8,0 etwas höher als errechnet. Bei einer angenommenen Veränderung des intrazellulären Verteilungsraumes von 10 % bei pH-Abnahme von 7,4 auf 6,8 bzw. bei pH-Zunahme von 7,4 auf 8,0 würden die Bindungswerte um 0,6 % tiefer bzw. höher liegen. Diese Bindungsänderung wurde bei den Werten in Tab. 4 nicht berücksichtigt, da sie zumindest bei Chlorimipramin in den Bereich der Standardabweichung fällt und ihre Größe nicht genau bestimmt werden kann (da die angenommene Veränderung des Verteilungsvolumens einen Maximalwert darstellt, dürfte die Bindungsänderung noch etwas unter 0,6 %

liegen).

Im näheren Bereich um den physiologischen pH 7,4 ändert sich also die Hämoglobinbindung der zwei untersuchten Substanzen nicht wesentlich. Allerdings scheint zumindest Toloniumchlorid in alkalischem Milieu höher gebunden zu werden. Diese Gesetzmäßigkeit gilt anscheinend für mehrere Pharmaka: So fand auch Curry (1969) bei der Untersuchung der Plasmaproteinbindung von Chlorpromazin eine Zunahme der Bindung um 9,9 % bei Änderung des pH-Wertes von 4 auf 10.

Bei Barbituraten besteht bei der Bindung an Serumalbumine ein Bindungsmaximum bei pH 8,0 (Goldbaum u. Smith 1954), ähnlich verhalten sich Penicilline (Keen 1966): Bird u. Marshall (1967) führen dieses Phänomen auf strukturelle Veränderungen des Albuminmoleküls zurück, sie vermuten, daß die hydrophoben Zwischenräume, an denen die Proteinbindung stattfinden soll, bei pH-Werten um 8 am ausgeprägtesten sind.

Nach den hier gefundenen Ergebnissen scheint beim Hämoglobinmolekül ein ähnlicher Effekt möglich.

SCHLUßFOLGERUNGEN

Wie sich herausstellte, ist für die hier untersuchten Substanzen die Erythrocytenmembran keine Barriere für den Eintritt ins Zellinnere. Da dies für viele Substanzen zutrifft, ausgenommen sind die schlecht lipoidlöslichen (Schanker 1961, 1964), muß für die Pharmakokinetik jeweils die Hämoglobinbindung mitberücksichtigt werden.

Nachdem der Hämoglobinanteil im Blut mit 12-16 g/100 ml doppelt so hoch ist wie der Plasmaproteinanteil mit 6-8 g/100 ml, scheint eine Änderung des Schwerpunktes bei der Betrachtung der Proteinbindung notwendig, nachdem bisher das Hauptaugenmerk auf die Plasmaproteinbindung gerichtet war.

Es wäre einzuwenden, daß die Bestimmung an Erythrozyten allein erfolgte, daß bei Vorhandensein von Plasmaproteinen die Verteilung anders sein könnte: Jähnchen et al. (1971) bei Promazin u. Chlorpromazin, sowie Hahn et al. (1973), bei Chlorpromazin führten Bindungsstudien mit Lösungen durch, die sowohl Erythrozyten als auch Albumin enthalten, also eine dem Blut ähnlichere Zusammensetzung bieten: Es stellte sich dabei heraus, daß etwa 80 % der Substanz an die Erythrozyten gebunden wurden, etwa 20 % an das Albumin. Hier war die prozentuale Verteilung der Pharmaka weitgehend abhängig von der mengenmäßigen Zusammensetzung der Lösung.

Andererseits scheinen zumindest bei einigen Pharmaka die Verhältnisse komplizierter zu sein:

So fand Pulver (1965) bei der Untersuchung der Verteilung von Medikamenten zwischen Blutkörperchen und Plasma bei verschiedenen Konzentrationen unterschiedliches Verhalten: Von drei Sulfonamiden war bei einem die prozentuale Verteilung weitgehend konzentrationsunabhängig, bei einem anderen verteilte sich erst bei höheren Konzentrationen die Substanz auch auf die Erythrozyten, während bei einem dritten Sulfonamid bei höheren Konzentrationen der prozentuale Substanz-Anteil, der in die Zellen eindrang, anstieg. Durch Hinzufügen zusätzlicher Pharmaka änderte sich

das Verteilungsverhältnis zum Teil grundlegend. Aus diesen Ergebnissen wäre zu schließen, daß die Bedeutung der Plasmaproteine sowie der Erythrocyten als Bindungsort für Pharmaka letztlich aus der Bestimmung der Bindung an Plasmaproteine bzw. Erythrocyten allein nicht genau vorhergesagt werden kann:

Bei gleicher Bindungsaffinität der Substanzen an Plasmaproteine und Hämoglobin und Permeationsmöglichkeit durch die Erythrocytenmembran wird wohl der Hämoglobinanteil der intravasalen Proteinbindung von Arzneimitteln höher sein als der Plasmaproteinanteil, nachdem die Hämoglobinkonzentration im Blut deutlich die der Plasmaproteine übersteigt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Permeation neun basischer Pharmaka in menschliche Erythrocyten untersucht.

Erythrocytensuspensionen wurden mit 10^{-4} m Substanzlösungen versetzt, der in die Zellen eingedrungene Anteil wurde aus der Konzentration im Überstand nach Zentrifugation berechnet.

Alle Substanzen erreichten das Verteilungsgleichgewicht in kürzerer Zeit, als mit der angewandten Methode meßbar. Der Substanzanteil, der in die Erythrocyten eindrang, reicht von 26,2% bis 92,7 %. Unter der Annahme, die in die Zellen eingedrungene Substanz setze sich im wesentlichen aus einem an Hämoglobin gebundenen Anteil und einem im Zellwasser gelösten Anteil zusammen, wurde die Hämoglobinbindung berechnet. Die Bindungswerte liegen zwischen

38 % und 97,6 %. Es zeigt sich, daß die Bindung der Substanzen an Hämoglobin positiv korreliert ist mit ihrer Lipoidlöslichkeit.

Beim Vergleich mit der Bindung an isoliertes Humanhämoglobin (Hilzenbecher 1972) ergibt sich hinsichtlich der Rangfolge der Pharmaka weitgehende Übereinstimmung, jedoch liegt bei intakten Erythrozyten die errechnete Hämoglobinbindung durchwegs höher (zwischen 0,9 % und 24,3 %).

Als mögliche Erklärung wird die Adsorption an die Membranoberfläche diskutiert.

Eine Abhängigkeit der Bindung vom Ionisationsgrad ließ sich nicht finden.

Bei Chlorimipramin und Toloniumchlorid wurden auch Bestimmungen bei pH 6,8 und pH 8,0 vorgenommen: Es kam zu keiner, nach der angewandten Methode meßbaren Veränderung der Permeationsgeschwindigkeit, bei Toloniumchlorid war bei pH 8 die Bindung um 3 % höher als bei pH 7,4.

Die Rolle der Hämoglobinbindung bei der Bindung von Pharmaka an Blutbestandteile wird erörtert. Dabei wird festgestellt, daß auf Grund des Mengenanteils, gleiche Bindungsaffinität an Hämoglobin und Plasmaproteine vorausgesetzt, die Hämoglobinbindung vermutlich eine größere Rolle spielt als die Plasmaproteinbindung.

LITERATURVERZEICHNIS

AHTEE, L., PAASONEN, M.K.

Distribution of some phenothiazines in red blood cells and platelets

J. Pharm. Pharmacol. 18 , 126-128 (1966)

APGAR, V., PAPPER, E.M.

Transmission of drugs across the placenta

Curr. Res. Anesth. 31 , 309-320 (1952)

APPIAH, A.K.

Eignung verschiedener Verteilungsmodelle zur Beurteilung der Permeabilität biologischer Membranen für Arzneimittel

Dissertation, Univ. München (1971)

BAKER, J.B.E.

The effects of drugs on the foetus

Pharmacol. Rev. 12 , 37-90 (1960)

BEYER, K.-H., SADEE, W.

Spektrophotometrische Bestimmung von 5-Phenyl-1,4-benzodiazepin-Derivaten und Untersuchungen über den Metabolismus des Nitrazepams

Arzneimittel-Forsch. 19 , 1929-1931 (1969)

BIRD, A.E., MARSHALL, A.C.

Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients

Biochem. Pharmacol. 16 , 2275-2290 (1967)

BRATTON, A.C., MARSHALL, E.K.

A new coupling component for sulfanilamid determination

J. Biol. Chem. 328 , 537-550 (1939)

BRODIE, B.B., AXELROD, J.

The fate of aminopyrine (Pyramidon) in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material

J. Pharmacol. exp. Therap. 99, 171-184 (1950)

BRODIE, B.B., HOGBEN, C.A.M.

Some physico-chemical factors in drug action

J. Pharm. Pharmacol. 9, 345-380 (1957)

BRODIE, B.B., KURZ, H., SCHANKER, L.S.

The importance of dissociation constant and lipid-solubility in influencing the passage of drugs into the cerebrospinal fluid

J. Pharmacol. exp. Therap. 130, 20-25 (1960)

BUTLER, T.C.

The delay in onset of action of intravenously injected anesthetics

J. Pharmacol. exp. Therap. 100, 219-226 (1942)

CURRY, S.H.

Plasma protein binding of chlorpromazine

J. Pharm. Pharmacol. 22, 193-197 (1970)

DAVSON, H.

A comparative study of the aqueous humour and cerebrospinal fluid in the rabbit

J. Physiol. 129, 111-133 (1955)

FASCHING, H.

Die Permeation von Arzneimitteln durch die isolierte durchströmte menschliche Plazenta

Dissertation, Univ. München (1968)

FICHTL, B.

Die Bindung von Pharmaka an menschliches Muskel-
gewebe

Dissertation, Univ. München (1974)

FREEMAN, A.R., SPIRITES, M.A.

Effect of some phenothiazine derivates on the
hemolysis of red blood cells in vitro

Biochem. Pharm. 11 , 161-163 (1962)

FREEMAN, A.R., SPIRITES, M.A.

Effects of chlorpromazine on biological membranes II:
Chlorpromazine induced changes in human erythrocytes

Biochem. Pharm. 12 , 47-53 (1963)

FRICK, P.G.

Der Erythrocyt als Beispiel biologischer Zweck-
mäßigkeit

Schweiz. med. Wschr. 91 , 1245-1249 (1961)

GLASSER, H., KRIEGLSTEIN, J.

Die Eiweißbindung einiger Psychopharmaka mit tri-
zyklischem Ringsystem in Abhängigkeit von ihrer
chemischen Konstitution

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 265, 321-334
(1970)

GOLDBAUM, L.R., SMITH, P.K.

The interaction of barbiturates with serum albumin
and its possible relation to their disposition
and pharmacological actions

J. Pharmacol. exp. Therap. 111 , 197-209 (1954)

GREEN, A.L.

Ionization constants and water solubilities of
some aminoalkylphenothiazine tranquilizers and
related compounds

J. Pharm. Pharmacol. 19 , 10-16 (1967)

GRYNS, G.

Über den Einfluß gelöster Stoffe auf die rothen
Blutzellen, in Verbindung mit den Erscheinungen
der Osmose und Diffusion

Pflügers Arch. ges. Physiol. 63 , 86-119 (1896)

HAGERMANN, D.D., VILLEE, A.C.

Transport functions of the placenta

Physiol. Rev. 40 , 313-330 (1960)

HAHN, I., KRIEGLSTEIN, G., KRIEGLSTEIN, J., TSCHENTSCHER, K.

Distribution of chlorpromazine in a simplified
blood influenced by various drugs

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 278, 35-44 (1973)

HANKS, J.H., WALLACE, R.E.

Relation of oxygen and temperature in the pre-
servation of tissues by refrigeration

Proc. Soc. Exp. Biol. 71 , 196 (1949)

HANSCH, C., KIEHS, K., LAWRENCE, G.L.

The role of substituents in the hydrophobic bonding
of phenols by serum and mitochondrial proteins

J. Amer. chem. Soc. 87 , 5770 (1965)

HEDIN, S.G.

Über die Permeabilität der Blutkörperchen

Pflügers Arch. ges. Physiol. 68 , 229-338 (1897)

HENDERSON, L.J., BOCK, A.V., FIELD, H., Jr.,
STODDARD, J.L.

Blood as a physico-chemical system

J. biol. Chem. 59 , 379-431 (1924)

HILL, A.V.

The state of water in muscle and blood and the
osmotic behaviour of muscle

Proc. Roy. Soc. B 106 , 447-505 (1930)

HILZENBECHER, CH.

Die Bindung von Pharmaka an Humanhämoglobin

Dissertation, Univ. München (1972)

HÖBER, R., PUPILLI, G.

Neue Versuche über die Aufnahme von Farbstoffen
durch die roten Blutkörperchen

Pflügers Arch. ges. Physiol. 226, 585-599 (1931)

HOGBEN, C.A.M., SCHANKER, L.S., TOCCO, D.J.,

BRODIE, B.B.

Absorption of drugs from the stomach II.

The human

J. Pharmacol. exp. Therap. 120 , 540-545 (1957)

HOGBEN, C.A.M., TOCCO, D.J., BRODIE, B.B.,
SCHANKER, L.S.

On the mechanism of intestinal absorption of drugs
J. Pharmacol. exp. Therap. 125, 275-282 (1959)

HOUSSAY, B.A.

Human Physiology

Chap. 3 f: The erythrocytes

Mc Graw-Hill Book Company New York, Toronto, London
(1955)

HUTCHINSON, C.

The behaviour of human erythrocytes in aqueous
alcohol solutions

Arch. Biochem. Biophys. 38 , 35 (1952)

JACOBS, M.H.

The permeability of the erythrocyte

Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exptl. Pharm. 7 , 1-55
(1931)

JÄHNCHEN, E., KRIEGLSTEIN, J., KUNKEL, F.,
SAMUELS, W.J.

Die Bedeutung der Bindung von Pharmaka an Albumin
und Erythrocyten eines Perfusionsmediums der iso-
lierten Rattenleber

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 269, 67-84 (1971)

KAKEMI, K., ARITA, T., HORI, R., KONISHI, R.

Absorption and excretion of drugs XXX.

Absorption of barbituric acid derivatives from
rat stomach

Chem. pharm. Bull. 15 , 1534-1539 (1967)

Mc KAY, E.M.

The distribution of glucose in human blood

J. Biol. Chem. 97 , 685-689 (1932)

KEEN, P.M.

The binding of penicillins to bovine serum albumin

Biochem. Pharmacol. 15 , 447-463 (1966)

KIEHS, K., HANSCH, C., MOORE, L.

The role of hydrophobic bonding in the binding of organic compounds by bovine hemoglobin

Biochemistry 5 , 2602-2605 (1966)

KÜBLER, W., MÄNNL, H.F.K.

Die Permeation von Isoproterenol durch die Erythrocytenmembran des Menschen

Klin. Wochenschr. 48 , 944-946 (1970)

KURZ, H., WALLER, H.D.

Die Genauigkeit der optischen Bestimmung von Kohlenoxyd-Hämoglobin im Blut

Arch. Toxikol. 15 , 291-305 (1955)

KURZ, H.

Lipid solubility as an important factor for the penetration of drugs into the liver

Biochem. Pharmacol. 8 , 20-21 (1961)

KURZ, H.

Die Permeation von Giften in die Leber

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 247 , 164-179
(1964)

KURZ, H.

Die Bedeutung der Lipoidlöslichkeit in der Pharmakologie

Präp. Pharmazie 1 , 12 (1970)

KWANT, W.O., SEEMAN, P.

The membrane concentration of a local anesthetic (chlorpromazine)

Biochim. Biophys. Acta 183 , 530 (1969)

MAICKEL, R.P., SNODGRASS, W.R.

Studies on placental transfer of drugs :

Abstracts, 4th intern. congress on pharmacology in Basel, Switzerland, 450 (1969)

MAREN, T.H., ROBINSON, B., PALMER, R.F., GRIFFITH, M.E.

The binding of aromatic sulfonamides to erythrocytes

Biochem. Pharmacol. 6 , 21-46 (1960)

MARK, L.C., BURNS, J.J., BRAND, L., CAMPOMANES, C.I.

TROUSOF, N., PAPPER, E.M., BRODIE, B.B.

The passage of thiobarbiturates and their oxygen analogs into brain

J. Pharmacol. exp. Therap. 123 , 70-73 (1958)

MARSHALL, P.B.

Some chemical and physical properties associated with histamin antagonism

Brit. J. Pharmacol. 10 , 270-278 (1955)

MARTI, H.R.

Die Erythrocytenmembran

Schweiz. med. Wschr. 98 , 120 (1968)

MEZICK, J.A., SETTLEMIRE, C.T., BRIERLEY, G.P.,
BAREFIELD, K.P., JENSEN, W.N., CORNWELL, D.G.
Erythrocyte membrane interactions with menadione
and the mechanism of menadione-induced hemolysis
Biochim. Biophys. Acta 219 , 361-371 (1970)

MODRZEJEWSKI, F., TRUCHAN-RYGIEL, U.
Das Verhalten menschlicher Erythrocyten in Arznei-
mittellösungen
Pharmazie 25 , 485-488 (1970)

MOND, R., HOFFMANN, F.
Weitere Untersuchungen über die Membranstruktur der
roten Blutkörperchen. Die Beziehungen zwischen Durch-
lässigkeit und Molekularvolumen
Pflügers Arch. ges. Physiol. 219, 467-480 (1928)

MÜLLER, W., WOLLERT, U.
Interactions of benzodiazepines with human serum
albumin
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278, 301-312
(1973)

MURPHY, J.R.
Erythrocyte osmotic fragility and cell water in-
fluence of pH and temperature
J. Lab. clin. Med. 74, 319-324 (1969)

ORZECZOWSKI, G.
Über die Harnbildung in der Froschniere.
XX. Mitteilung: Über den Mechanismus der Ausschei-
dung von Säurefarbstoffen
Pflügers Arch. ges. Physiol. 225, 104-117 (1930)

PERRIN, D.D.

Dissociation constants of organic bases in aqueous solution

S.441, Butterworths, London (1965)

PONDER, E., Mac LEOD, J.

Solvent water in the mammalian erythrocyte

J. Physiol. 86, 147-152 (1936)

PULVER, R.

Die Verteilung von Medikamenten zwischen Blutkörperchen und Plasma

Arzneimittel-Forsch. 15, 1363-1365 (1965)

RALL, D.P., STABENAU, J.R., ZUBROD, C.G.

Distribution of drugs between blood and cerebrospinal fluid: General methodology and effect of pH gradients

J. Pharmacol. exp. Therap. 125, 185-193 (1959)

SALZMANN, N.P., BRODIE, B.B.

Physiological disposition and fate of chlorpromazine and a method for its estimation in biological material

J. Pharmacol. exp. Therap. 118, 46-54 (1956)

SCHANKER, L.S., SHORE, P.A., BRODIE, B.B.,

HOGBEN, C.A.M.

Adsorption of drugs from the stomach. I. The rat

J. Pharmacol. exp. Therap., 120, 528-539 (1957)

SCHANKER, L.S., TOCCO, D.J., BRODIE, B.B.,

HOGBEN, C.A.M.

Absorption of drugs from the rat small intestine

J. Pharmacol. exp. Therap., 123, 81-88 (1958)

SCHANKER, L.S., NAFPLIOTIS, P.A., JOHNSON, J.M.
Passage of organic bases into human red cells
J. Pharmacol. exp. Therap. 133, 325-351 (1961)

SCHANKER, L.S.
Passage of drugs across body membranes
Pharmacol. Rev. 14, 501-503 (1962)

SCHANKER, L.S., JOHNSON, J.M., JEFFREY, J.J.
Rapid passage of organic anions into human red cells
Amer. J. Physiol. 207, 503-508 (1964)

SCHOLTAN, W.
Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper
Arzneim.-Forsch. 14, 469-473 (1964)

SCHOLTAN, W.
Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin
und Ribonucleinsäure
Arzneim.-Forsch. 18, 505-517 (1968)

SEEMAN, Ph.M.; BIALY, H.S.
The surface activity of tranquilizers
Biochem. Pharmacol. 12, 1181-1191 (1963)

SEEMAN, P., KWANT, W.O., SAUKS, T.
Membrane expansion of erythrocyte ghosts by
tranquilizers and anesthetics
Biochim. Biophys. Acta 183, 499-511 (1969)

SGARAGLI, G., ZILLETI, L.
Passage of 4-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone
into human erythrocyte
Pharmacol. Res. Communic. 2, 31-38 (1970)

SHORE, P.A., BRODIE, B.B., HOGBEN, C.A.M.
The gastric secretion of drugs: A pH partition
hypothesis
J. Pharmacol. exp. Therap. 119, 361-369 (1957)

SIEGENTHALER, W.
Klinische Pathophysiologie
G. Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 392 (1970)

Van SLYKE, D.D., WU, H., Mc LEAN, F.C.
Studies of gas and elektrolyte equilibria in the
blood
J. Biol. Chem. 56, 765-849 (1923)

SUNDERMANN, F.W.
The osmotic behaviour of water of blood serum
J. Biol. Chem. 96, 271-283 (1932)

TOYKA, G.
Gegenseitige Beeinflussung von Pharmaka bei ihrer
Bindung an Humanhämoglobin
Dissertation, Univ. München (1974)

ZÄHLER, P.
Aufbau und Funktion der Erythrocytenmembran
Schweiz. med. Wschr. 101, 1490-1492 (1971)

LEBENS LAUF

Am 21.1.1949 wurde ich als Sohn des Prokuristen Josef Dunau und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Reusch in Elz bei Limburg an der Lahn geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Unterbernbach bei Aichach, 1968 legte ich mein Abitur am Humanistischen Gymnasium bei St. Stephan in Augsburg ab.

Vom Wintersemester 1968/69 an studierte ich Medizin an der Universität München, die ärztliche Prüfung bestand ich im August 1974.

Nach der Medizinalassistentenzeit im Kreiskrankenhaus Aichach wurde ich im Februar 1976 zur Bundeswehr eingezogen und war 15 Monate am Fliegerhorst Landsberg als Truppenarzt tätig.

Seit Mai 1977 arbeite ich als Assistenzarzt an der inneren Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder in Neuburg an der Donau.

